

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003451

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-059551
Filing date: 03 March 2004 (03.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

11.3.2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月 3日

出願番号
Application Number: 特願 2004-059551

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

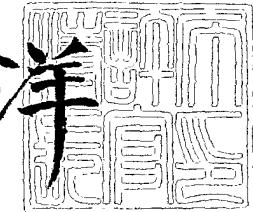
J P 2004-059551

出願人
Applicant(s): 独立行政法人農業生物資源研究所
独立行政法人理化学研究所

2005年 4月 19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特 2005-3035368

【書類名】 特許願
【整理番号】 MOA-A0402
【提出日】 平成16年 3月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
【氏名】 賀来 華江
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
【氏名】 渋谷 直人
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
【氏名】 南 栄一
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
【氏名】 南 尚子
【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
【氏名】 西澤 洋子
【発明者】
【住所又は居所】 奈良県奈良市あやめ池南4丁目1-29
【氏名】 瀧尾 擭士
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県和光市新倉2934-1-106
【氏名】 堂前 直
【特許出願人】
【識別番号】 501167644
【氏名又は名称】 独立行政法人農業生物資源研究所
【特許出願人】
【識別番号】 503359821
【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【弁理士】
【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 041092
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDN

A

(d) 配列番号：2 または 4 に記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

【請求項 2】

植物がイネである、請求項 1 に記載のDNA。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のDNAによりコードされるタンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載のDNAを含むベクター。

【請求項 5】

請求項 1 もしくは 2 に記載のDNA、または請求項 4 に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

【請求項 7】

イネ由来である、請求項 6 に記載の形質転換植物体。

【請求項 8】

請求項 6 または 7 に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体

。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。

【請求項 10】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、請求項 1 もしくは 2 に記載のDNA、または請求項 4 に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

【請求項 11】

請求項 1 もしくは 2 に記載のDNA、または請求項 4 に記載のベクターを含有する、植物の病害防除に用いる薬剤。

【請求項 12】

植物がイネである、請求項 11 に記載の薬剤。

【請求項 13】

病害がいもち病である、請求項 12 に記載の薬剤。

【請求項 14】

請求項 3 に記載のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法。

【請求項 15】

植物がイネである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

病害がいもち病である、請求項 15 に記載の方法。

【書類名】明細書

【登録名】キチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質

【技術分野】

[0001]

本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質に関する。

本研究方法、 【背景技術】

南京汉简

[0 0 0 3]

本発明者らは、これまで糸状菌細胞壁の構成多糖であるキチンの特定サイズの断片が、nMオーダーという低濃度でイネ培養細胞のファイトアレキシン合成、膜の脱分極、イオンの流入・流出、タンパク質のリン酸化、活性酸素の生成、ジャスモン酸合成、キチナーゼやPAL（フェニルアラニンアンモニアリアーゼ）等の遺伝子発現を引き起こすことを明らかにしてきた（非特許文献1～6参照）。また、このエリシターの脱アセチル体であるキトサンオリゴ糖及び重合度5以下のキチンオリゴ糖では、これらの細胞応答のレベルが低く下することも示した。これらの事実は、イネ培養細胞には、キチンオリゴ糖のサイズと構造を厳密に認識する受容体が存在することを示している。本発明者らは、¹²⁵I標識したキチンオリゴ糖を用いた実験から、イネの原形質膜画分に高親和性のエリシター結合タンパク質が存在し、生化学的な解析から、培養細胞に対するエリシター活性とよく対応した結合特異性を持つことも確認している（非特許文献7～9参照）。

〔0 0 0 4〕

なお、本願発明に関する先行技術文献を以下に示す。

【非特許文献1】Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T.: Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 405-409(1993)

【非特許文献2】Minami, E., Kuchitsu, K., He, D.-Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y. and Shibuya, N.: Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with N-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant Cell Physiol.*, 37, 563 (1996)

【非特許文献3】Kikuyama, M., Kuchitsu, K. and Shibuya, N.: Membrane depolarization induced by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 902-909 (1997)

【非特許文献4】He, D.-Y., Yazaki, Y., Nishizawa, Y., Takai, R., Yamada, K., Sakano, K., Shibuya, N. and Minami, E. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe. Interact.*, 11, 1167 (1998)

【非特許文献5】R. Takai, K. Hasegawa, H. Kaku, N. Shibuya and E. Minami: Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, EL5, which show

s structural similarity to ATL family from Arabidopsis, in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor. Plant Science, 160, 577-583 (2001)

【非特許文献6】 Yamaguchi, T., Minami, E. and Shibuya, N.: Activation of phospholipases by N-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells mediates reactive oxygen generation, Physiol. Plant., 118, 361-370, (2003)

【非特許文献7】 Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K., and Miliarik, M.J.: Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. FEBS Lett., 329, 75-78 (1993)

【非特許文献8】 Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. and Ito, Y.: Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. Plant Cell Physiol., 37, 894-898 (1996)

【非特許文献9】 Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. : Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. The Plant Journal, 12(2), 347-356 (1997)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質、及びその利用方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。キチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質を、キチンオリゴ糖エリシターへの結合活性を保持したまま、キチンオリゴ糖鎖を固定化したカラムにより精製する方法に関しては、膜タンパク質の可溶化条件の設定、非特異的吸着タンパク質などの混入を防ぐためのプレカラムの工夫、吸着容量・回収率を高めるための親和性担体のデザインと溶出条件の設定などに種々の検討を必要とした。具体的には、Triton X-100 による原形質膜タンパク質の可溶化、APEA誘導体 ((G1cNAc)₈-APEA (aminophenylethylamino)誘導体) を用いたカラムの開発、非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせることで、収率良くエリシターリンパク質を単離精製した。次いで、N末端アミノ酸配列及び内部鎖アミノ酸配列を解読し、これらのアミノ酸配列情報に基づいて、イネcDNAライブラリーから本発明のタンパク質をコードするcDNAの単離に成功した。

【0007】

本発明のタンパク質は糖タンパク質であり、Con Aレクチンに結合する。そこでCon Aカラムに結合するイネ原形質膜画分に対する抗体を作成し、種々のクロマトグラフィーを工夫し、本目的タンパク質に対する抗体（抗Con A-CEBiP抗体）を精製した。抗Con A-CEBiP抗体がエリシター応答性活性酸素生成へ与える影響を調べたところ、抗Con A-CEBiP抗体で前処理することにより活性酸素生成は阻害され、本発明のタンパク質がキチンオリゴ糖エリシター応答に関わる受容体タンパク質であることが示唆された。

【0008】

即ち、本発明は、以下の〔1〕～〔16〕を提供するものである。

〔1〕以下の(a)～(d)のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

A

(d) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

[2] 植物がイネである、[1]に記載のDNA。

[3] [1]または[2]に記載のDNAによりコードされるタンパク質。

[4] [1]または[2]に記載のDNAを含むベクター。

[5] [1]もしくは[2]に記載のDNA、または[4]に記載のベクターを保持する形質転換植物細胞。

[6] [5]に記載の形質転換植物細胞を含む形質転換植物体。

[7] イネ由来である、[6]に記載の形質転換植物体。

[8] [6]または[7]に記載の形質転換植物体の子孫またはクローンである、形質転換植物体。

[9] [6]～[8]のいずれかに記載の形質転換植物体の繁殖材料。

[10] [6]～[8]のいずれかに記載の形質転換植物体の製造方法であって、[1]もしくは[2]に記載のDNA、または[4]に記載のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法。

[11] [1]もしくは[2]に記載のDNA、または[4]に記載のベクターを含有する、植物の病害防除に用いる薬剤。

[12] 植物がイネである、[11]に記載の薬剤。

[13] 病害がいもち病である、[12]に記載の薬剤。

[14] [3]に記載のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法。

[15] 植物がイネである、[14]に記載の方法。

[16] 病害がいもち病である、[15]に記載の方法。

【発明の効果】

【0009】

エリシターは、植物において、種々の生体防御関連遺伝子を誘導し、防御反応を引き起こすことが知られている。本発明のタンパク質はエリシターの受容体であると考えられるので、本発明のタンパク質を過剰発現させることで、種々な生体防御応答を誘導できる。よって、本発明のタンパク質を用いることで、新規な、いもち病などの病害防除技術が提供されると考えられる。また、イネのみでなく多くの植物にも本発明のタンパク質と同様存在する。本遺伝子情報が明らかになることで、植物が病原菌由来のシグナル分子（エリシター）を認識し、細胞内・細胞間シグナル伝達経路を経て生体防御関連遺伝子の発現を誘導するメカニズムが明らかになることも期待され、病害に強いイネを含む、多くの作物の育種の開発に寄与することが考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明者らは、植物におけるキチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質（CEBiP）を高い収率で単離精製し、該遺伝子配列を解読した。

【0011】

本発明は、以下の(a)～(d)のいずれかに記載の、キチンオリゴ糖エリシターに対して結合活性を有する植物のタンパク質をコードするDNA、および、該DNAによりコードされるタンパク質を提供する。

(a) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNA

(c) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA

(d) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードす

るDNA

【0012】

本発明における上記植物としては、特に限定されず、例えば、穀類、野菜、および果樹等の有用農作物、観葉植物等の鑑賞用植物等が挙げられる。具体的には、該植物として、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、ナタネ、ダイズ、ワタ、ニンジン、トマト、ジイネ、ヤガイモ、キク、バラ、カーネーション、シクラメン、シロイヌナズナ等を例示することができる。本発明の上記植物としては、好ましくはイネを挙げることができる。

【0013】

本発明のエリシター結合タンパク質のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また、上記cDNAからシグナルペプチドをコードする部分を除いたDNAの塩基配列を配列番号：3、該DNAによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。本発明のタンパク質は、内部に4種類の配列（配列表の配列番号：4の139番目から152番目までの配列、154番目から161番目までの配列、164番目から176番目までの配列、及び177番目から182番目までの配列）を有する。

【0014】

本発明のDNAは、当業者においては、一般的に公知の方法により単離することが可能である。例えば、ハイブリダイゼーション技術（Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.）やポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術（Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350.、Saiki, RK. et al., Science 1988, 239, 487.）を利用する方法が挙げられる。すなわち、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAもしくはその一部をプローナとして、また配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリブとして、また配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAを単離することは、当業者にとつて通常行い得ることである。このように、ハイブリダイゼーション技術やPCR技術によって単離し得る、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAもまた、本発明のDNAに含まれる。

【0015】

このようなDNAを単離するためには、好ましくは低ストリンジエントな条件下でハイブリダイゼーション反応を行う。本発明において低ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件（穏やかなハイブリダイゼーション条件）とは、5X SSPE、1% SDS(W/V)、0.1% BSA、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、100ug/ml 変性サケ精巣DNA、またはこれと同等のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。また、高ストリンジエントなハイブリダイゼーション条件、例えば、25% ホルムアミド(V/V)、5X SSPE、1% SDS(W/V)、0.1% BSA、0.1% ポリビニルピロリドン、0.1% フィコール400、100ug/ml 変性サケ精巣DNAの条件下では、より相同意の高いDNAを単離できることが期待される。こうして単離されたDNAは、アミノ酸レベルにおいて、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列と高い相同意を有すると考えられる。高い相同意とは、アミノ酸配列全体で少なくとも35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%以上の配列の同一性を指す。

【0016】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1990, 87, 2264-2268.、Karlin, S. & Altschul, S.F., Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 1993, 90, 5873.) を用いて決定できる。BLASTのアルゴリズムに基づいたBLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul, S.F. et al., J Mol Biol, 1990, 215, 403.)。BLASTNを用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=100、wordlength=12とする。また、BLASTXを用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

【0017】

また、本発明は、本発明のエリシター結合タンパク質と構造的に類似しているタンパク質、および該タンパク質をコードするDNAも提供する。このようなタンパク質をコードするDNAとしては、該タンパク質において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加、おもにまたは挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAが挙げられる。例えば、本発明のエリシター結合タンパク質のホモログであって、糖鎖結合可能なサイト(NXT(S))を有し、LysMドメインを有する糖タンパク質をコードするDNAが例示できる。

【0018】

上記のDNAを調製するために、当業者によく知られた方法としては、上記ハイブリダイゼーション技術 (Southern, EM., J Mol Biol, 1975, 98, 503.) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki, RK. et al., Science, 1985, 230, 1350.、Saiki, RK. et al., Science, 1988, 239, 487.) の他に、例えば、該DNAに対し、site-directed mutagenesis 法 (Kramer, W. & Fritz, HJ., Methods Enzymol, 1987, 154, 350.) により変異を導入する方法が挙げられる。改変されるアミノ酸の数は、改変後のタンパク質が、本発明のエリシター結合タンパク質と構造的に類似している限り、特に制限はないが、一般的には、50アミノ酸以内、好ましくは30アミノ酸以内、より好ましくは10アミノ酸以内（例えば、50アミノ酸以内、好ましくは30アミノ酸以内、より好ましくは10アミノ酸以内（例えば、5アミノ酸以内、3アミノ酸以内）である。アミノ酸の改変は、好ましくは保存的置換である。改変前と改変後の各アミノ酸についてのhydropathic index (Kyte and Doolittle, (1982) J Mol Biol. 1982 May 5;157(1):105-32) やHydrophilicity value (米国特許第4,5582, J Mol Biol. 1982 May 5;157(1):105-32) やHydrophilicity value (米国特許第4,5582, 4,101号) の数値は、±2以内が好ましく、さらに好ましくは±1以内であり、最も好ましくは±0.5以内である。また、自然界においても、塩基配列の変異によりコードするタンパク質のアミノ酸配列が変異することは起こり得ることである。また、塩基配列が変異していても、その変異がタンパク質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）が存在する。この縮重変異DNAも本発明に含まれる。

【0019】

本発明のDNAには、ゲノムDNA、cDNA、および化学合成DNAが含まれる。ゲノムDNAおよびcDNAの調製は、当業者にとって常套手段を利用して行うことが可能である。ゲノムDNAは、例えば、上記の植物のエリシター結合タンパク質をコードする遺伝子を有する植物からゲノムDNAを抽出し、ゲノミックライブラリー（ベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミド、BAC、PAC等が利用できる）を作成し、これを展開して、該タンパク質をコードするDNAを基に調製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションあるいはPCRハイブリダイゼーションを行うことにより調製することが可能である。また、上記のエリシター結合タンパク質をコードするDNAに特異的なプライマーを作成し、これを用いたPCRを行うことによって調製することも可能である。また、cDNAは、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を有する植物から抽出したmRNAを基にcDNAを合成し、これを入ZAP等のベクターに挿入してcDNAライブラリーを作成し、これを展開して、上記と同様にコロニーハイブリダイゼーションあるいはPCRハイブリダイゼーションを行うことにより、また、PCRを行うことにより調製することが可能である。

【0020】

なお、本発明のDNAのうち天然由来のものは、キチンオリゴ糖エリシターにより誘導される。よって、本発明のDNAの誘導を指標に、被検植物体あるいは被検植物細胞に生体防御機構が作動しているか否かを判定できる。

【0021】

本発明のDNAは、その発現制御により表現型が改変された形質転換植物体の作出などに利用することが可能である。また、本発明のDNAは、例えば、組み換えタンパク質の調製に利用できる。エリシターは植物の生体防御のシグナル伝達過程の分子機構の研究において、重要な物質である。

【0022】

組み換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のDNAを適当な発現ベクターに

挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組み換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国New England Biolabs社発売のベクターpMALシリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech社発売のベクターpGEXシリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen社のpETシリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組み換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、発現ベクターを変えることにより、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（Mandel, M. & Higa, A., *Journal of Molecular Biology*, 1970, 53, 158-162.、Hanahan, D., *Journal of Molecular Biology*, 1983, 166, 557-580.）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組み換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することができる。組み換えタンパク質を上記のマルトース結合タンパク質などの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。このようにして作製される本発明のDNAによってコードされるタンパク質もまた、本発明に含まれる。

【0 0 2 3】

【0023】 本発明のタンパク質は、植物培養細胞の原形質膜から単離精製することもできる。本発明には、以下の工程によって精製されるタンパク質も含まれる。

（1）界面活性剤により原形質膜タンパク質を可溶化する工程
 （2）（1）で得られた可溶化画分中のキチンオリゴ糖エリシター結合タンパク質を (G1
 $c\text{NAc})_8\text{-APEA}$ 誘導体に結合させる工程
 （3）（2）で結合したタンパク質を溶出させる工程

[0024]

【0 0 2 5】

本発明のタンパク質を用いることにより、これに結合する抗体を調製することも可能である。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血ペいを除去した血清より調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単一クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得る。

ことにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用することが可能である。本発明には、本発明のタンパク質に結合する抗体が含まれる。また、本発明の抗体には、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびこれら抗体の断片が含まれる。

[0026]

【0020】 また本発明は、上記DNAまたは核酸を含むベクター、該ベクターを保持する形質転換植物細胞、該形質転換植物細胞を含む形質転換植物体、該形質転換植物体の子孫またはクローリングである形質転換植物体、および該形質転換植物体の繁殖材料を提供する。本発明の植物体は、本発明のタンパク質を生産するために利用できる。また、該植物体は、いもち病などの病害を防除する機能を有する。

[0 0 2 7]

本発明のDNAを発現する形質転換植物体を作製する場合には、本発明のDNAを適当なベクターに挿入して、これを植物細胞に導入し、これにより得られた形質転換植物細胞を再生させる。

[0 0 2 8]

さらに、本発明は、上記の形質転換植物体の製造方法であって、本発明のDNAまたは核酸、あるいは本発明のベクターを植物細胞に導入し、該植物細胞から植物体を再生させる工程を含む方法を提供する。

[0029]

本発明のDNAまたは核酸の植物細胞への導入は、当業者においては、公知の方法、例えばアグロバクテリウム法、電気穿孔法（エレクトロポーレーション法）、パーティクルガン法により実施することができる。

[0 0 3 0]

上記アグロバクテリウム法を用いる場合、例えばNage1らの方法 (Microbiol. Lett., 1990, 67, 325.) が用いられる。この方法によれば、組み換えベクターをアグロバクテリウム細菌中に形質転換して、次いで形質転換されたアグロバクテリウムを、リーフディスク法等の公知の方法により植物細胞に導入する。上記ベクターは、例えば植物体に導入した後、本発明のDNAが植物体中で発現するように、発現プロモーターを含む。一般に、該プロモーターの下流には本発明のDNAが位置し、さらに該DNAの下流にはターミネーターが位置する。この目的に用いられる組み換えベクターは、植物への導入方法、または植物の種類に応じて、当業者によって適宜選択される。上記プロモーターとして、例えばカリフラワー由来のCaMV35S、トウモロコシのユビキチンプロモーター (特開平2-79983号公報) 等を挙げることができる。

[0 0 3 1]

また、上記ターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター、あるいはノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等を例示することができるが、植物中で機能するプロモーターやターミネーターであれば、これらに限定されない。

[0 0 3 2]

【0032】 また、本発明のDNAまたは核酸を導入する植物は、外植片であってもよく、これらの植物から培養細胞を調製し、得られた培養細胞に導入してもよい。本発明の「植物細胞」は、例えば葉、根、茎、花および種子中の胚盤等の植物細胞、カルス、懸濁培養細胞等が挙げられる。

[0 0 3 3]

また、本発明のDNAまたは核酸の導入により形質転換した植物細胞を効率的に選択するために、上記組み換えベクターは、適当な選抜マーカー遺伝子を含む、もしくは選抜マーカー遺伝子を含むプラスミドベクターと共に植物細胞へ導入するのが好ましい。この目的に使用する選抜マーカー遺伝子は、例えば抗生物質ハイグロマイシンに耐性であるハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、カナマイシンまたはゲンタマイシンに耐性であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、および除草剤ホスフィノスリシンに耐性であるアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。

【0034】

組み換えベクターを導入した植物細胞は、導入された選抜マーカー遺伝子の種類に従つて適当な選抜用薬剤を含む公知の選抜用培地に置床し培養する。これにより形質転換された植物培養細胞を得ることができる。

【0035】

次いで、本発明のDNAまたは核酸を導入した形質転換細胞から植物体を再生する。植物体の再生は植物細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である (Toki. et al., Plant Physiol, 1995, 100, 1503-1507.)。例えばイネにおいては、形質転換植物を作出する手法については、ポリエチレン glycol によりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (インド型イネ品種が適している) を再生させる方法 (Datta, S K. et al., In Gene Transfer To Plants (Potrykus I and Spangenberg Eds.), 1995, 66-74.) 、電気パルスによりプロトプラストへ遺伝子導入し、植物体 (日本型イネ品種が適している) を再生させる方法 (Toki. et al., Plant Physiol, 1992, 100, 1503-1507.) 、パーカルガン法により細胞へ遺伝子を直接導入し、植物体を再生させる方法 (Christou, et al., Bio/technology, 1991, 9, 957-962.) およびアグロバクテリウムを介して遺伝子導入し、植物体を再生させる方法 (Hiei. et al., Plant J, 1994, 6, 271-282.) 等、いくつかの技術が既に確立し、本願発明の技術分野において広く用いられている。本発明においては、これら的方法を好適に用いることができる。

【0036】

形質転換細胞から再生させた植物体は、次いで馴化用培地で培養する。その後、馴化した再生植物体を、通常の栽培条件で栽培すると、植物体が得られ、成熟して結実して種子を得ることができる。

【0037】

なお、このように再生され、かつ栽培した形質転換植物体中の導入された外来DNAまたは核酸の存在は、公知のPCR法やサザンハイブリダイゼーション法によって、または植物体中の核酸の塩基配列を解析することによって確認することができる。この場合、形質転換植物体からのDNAまたは核酸の抽出は、公知のJ. Sambrookらの方法 (Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989) に準じて実施することができる。

【0038】

再生させた植物体中に存在する本発明のDNAよりなる外来遺伝子を、PCR法を用いて解析する場合には、上記のように再生植物体から抽出した核酸を錆型として増幅反応を行う。また、本発明の核酸がDNAである場合には、該DNAの塩基配列に従って適当に選択された塩基配列をもつ合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、これらを混合させた反応液中において増幅反応を行うこともできる。増幅反応においては、DNAの変性、アニーリング、伸張反応を数回繰り返すと、本発明のDNA配列を含むDNA断片の増幅生成物を得ることができる。増幅生成物を含む反応液を、例えばアガロース電気泳動にかけると、増幅された各種のDNA断片が分画されて、そのDNA断片が本発明のDNAに対応することを確認することができる。

【0039】

一旦、染色体内に本発明のDNAが導入された形質転換植物体が得られれば、該植物体から有性生殖または無性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローニングから繁殖材料 (例えば種子、果実、切穂、塊茎、塊根、株、カルス、プロトプラスト等) を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。

【0040】

本発明は、植物の病害防除のための薬剤を提供する。本明細書において、植物の病害防除とは、病原菌や害虫などの病原体の侵入に対する植物の自己防御反応を増強させる機能を意味する。具体的には、植物が病害を受けた際に起こす、膜の脱分極、活性酸素の生成、ファイトアレキシン等の抗菌物質の合成等の機能をいう。

【0041】

病害としては、紋枯病、コムギ黒変病、オオムギ斑点病、イネごま葉枯病が挙げられるが、好ましくは、イネいもち病である。

【0042】

本発明の薬剤とは、本発明のDNAまたはベクター自体、または、本発明のDNAまたはベクターを含有する組成物のことである。前記において、「組成物」は種々の物質を含有することができる。そのような物質は、該組成物が本発明の目的を達成することができるものであれば特に限定はないが、例えば、該DNAまたはベクターが安定的に存在するための物質、該DNAまたはベクターの植物細胞内への導入を補助する物質、該DNAやベクターの計量を容易にする増量のための物質等を挙げることができる。

【0043】

本発明はまた、本発明のタンパク質を植物体の細胞内で発現させることを特徴とする、植物の病害防除方法を提供する。タンパク質等を植物体の細胞内で発現させる方法は、上述のとおりである。

【実施例】

【0044】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、実施例は、下記の材料および方法に従って実施した。

1. 培養細胞及び原形質膜の調製

イネ培養細胞(*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare)はN6培地を改変したL培地(Kuchitsu, K., Kikuyama, M., and Shibuya, N. *Protoplasma*, 174, 79-81(1993))を用い、インキュベータ中にて25℃、暗所、150 rpmの振盪条件下で行い、振盪培養により継代維持・増殖を行い実験に用いた。

【0045】

イネ培養細胞は2週に1回、滅菌した1 mm角の金網上で裏ごし、細かくした細胞塊を継代にした。なお、各実験においては、この裏ごしすることによる刺激の影響を考慮して、この処理をしてから4日以上経過したもの用いた。

【0046】

イネ培養細胞から原形質膜の調製は、渋谷らの方法(Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. and Ito, Y. *Plant Cell Physiol.*, 37, 894-898(1996))に従って分画遠心分離法により得たミクロソーム画分(microsomal fraction: MF)を、デキストラン/ポリエチレングリコールを用いた水性2層分配法により分画して調製した。得られた原形質膜画分は1~2 mlのPMバッファーに懸濁し、超音波処理で均一にしたのち、-80℃で保存した。

【0047】

2. エリシター糖及びその誘導体

エリシターとして用いたキチンオリゴ糖($(GlcNAc)_n$)の6量体以下のものは生化学工業株式会社製のfine grade標品を用い、7量体および8量体は焼津水産化学工業より譲渡されたカニ甲殻由来のキトサンオリゴ糖7量体および8量体をそれぞれ再アセチル化することより調製した。

【0048】

$(GlcNAc)_8$ -APEA誘導体及び $(GlcNAc)_8$ -APEAへの放射性ヨウ素 ^{125}I の導入は、伊藤らの方法(Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. *The Plant Journal*, 12(2), 347-356 (1997))に従った。

【0049】

3. アフィニティラベリング

グルタルアルデヒドによるエリシター結合タンパク質アフィニティラベリングは、 ^{125}I - $(GlcNAc)_8$ -APEA誘導体のアミノ基とタンパク質側鎖のアミノ基同士がNaCNBH₃を触媒としてグルタルアルデヒドを介して架橋するものであり、伊藤らの方法(Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya N. *The Plant Journal*, 12(2), 347-356 (1997))に従って行った。

【0050】

イネの原形質膜、可溶化原形質膜画分或いは精製したCEBiP画分と100 nM (30 pmol) AP EA誘導体を (液量250 μ l) 氷中で1時間反応させ、30 μ gのNaCNBH₃を含む30 μ lの2.5%グルタルアルデヒド溶液を加え、室温で30分反応させた。反応後、25 μ lの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、一晩-80°Cにて放置したのち、遠心分離 (15,000 rpm、2時間) を行い、沈殿画分をSDS電気泳動に供した。SDS電気泳動は、Multiphor IIマルチパーザ電気泳動装置によるプレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル (Pharmacia) を用いて、あるいはスラブゲル用電気泳動装置で、ポリアクリルアミド濃度10%, 15%もしくは5-20%のグラジエントゲル (PAGEL、ATTO) で行った。泳動後にゲルを50%メタノール/10%酢酸水溶液中で30分間固定化処理し風乾したゲル、あるいはゲル内のタンパク質をPVDFメンブレン (Millipore イモビロン-PSQ トランスファーメンブレン) に転写したのち、バイオイメージングプレートに2~7日間感光させた。プレートをイメージングプレートリーダー及びバイオイメージングアナライザ (BAS 2000、富士フィルム) で解析し、放射性ラベルされたタンパク質を検出した。

[0 0 5 1]

(実施例1)キチンエリシター結合タンパク質の精製とアミノ酸配列の解析

CEBiPタンパク質精製に用いたアフィニティーカラムは(GlcNAc)₈-APEA誘導体(75 mg)及びグリシンをそれぞれActivated CH-Sepharose 4Bゲル担体(乾燥ゲル5 g)にファルマシア社付属マニュアルに従って固定化することにより調製した。

[0.052]

CEBiPの精製は、以下のように行った。原形質膜画分 (20.46 mg) を0.5% Triton X-100を含むTBSバッファー (2mM DTT、1mM PMSF、0.15M NaCl、1mM MgCl₂、25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)) で4℃、1時間反応させた後、卓上超遠心機 (4℃、70,000 rpm、1時間) にて得られた上清を可溶化原形質膜画分とした。

[0.053]

イネ培養細胞原形質膜からのエリシター結合蛋白質の可溶化には、Triton X-100やn-dodecyl- β -maltoside等の界面活性剤が有効であった。0.5%濃度のTriton X-100により60%の原形質膜タンパク質が可溶化され、 125 Iラベルしたエリシター誘導体との結合実験から、エリシター結合タンパク質の約30%が活性型として回収された。可溶化画分中の結合活性は、原形質膜を用いて得られた結果とよく対応する結合特性を示し、親和性標識の結果からも目的とするエリシター結合タンパク質が活性を保持して可溶化されたことが確認された。

[0 0 5 4]

この画分を連結した3本のカラム (Aカラム: Sephadex G-75 (15 ml); Bカラム: Glycine-e-CH-Sepharose 4B (10 ml); Cカラム: (GlcNAc)₈-APEA-CH-Sepharose4B (11 ml)) に供した(図1)。微量な精製タンパク質がシリコンチューブやカラムのガラス表面に非特異的吸着で損失することを防ぐために、予め、連結カラム及びチューブ等を1% 卵白アルブミン (OVA) 次いで、0.17 M Glycine-HCl bufferで洗浄後、0.005% Triton X-100を含むTB S バッファーで平衡化した。次に、可溶化した原形質膜画分を、セファロースゲル担体やデキストランに吸着する物質を除去するために目的カラム (Cカラム) の前に2本のカラム (Aカラム、Bカラム) を付けた、連結カラムで分画した。Cカラムには高吸着容量の新しい親和性クロマト用担体として(GlcNAc)₈-APEA (aminophenylethylamino)誘導体を用いた。次いで、未吸着物質を除くためカラムをTBSバッファーで洗浄した。目的カラムであるCカラムを、非エリシター糖であるセロヘキサオース及びキトサンヘキサオース混合溶液 (カラムを、1 mg/ml、20 ml) で洗浄後、目的タンパク質を0.17 M Glycine-HCl buffer (pH 2.3) で溶出した。溶出画分は、1 M Tris溶液で直ちに中和し、全量を275 μ lとしたのち、各チューブに25 μ lの5 M NaCl及び1.2 ml MeOHを加え、-80°Cに一晩放置した。遠心分離により目的タンパク質を回収し、最終容量を80 μ lになるように溶かした。その1 μ lをMultiphor IIマルチパープス電気泳動装置で、プレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)で電気泳動後、銀染色を行った。このように、APEA誘導体を用いたカラムと非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせ

ることで収率良く結合タンパク質を単離精製することができた。この方法で精製した画分にはMultiphor II電気泳動装置を用いたSDS電気泳動で75kDa、55kDaの2つのバンドが検出された（図1）。

【0055】

残りの精製タンパク質溶液は、ATT0の15%ポリアクリルアミドSDS電気泳動に供し、PVDF膜に転写、CBB染色後、目的タンパク質のバンドを切り出して、HP241プロテインシーケンサーシステム(HEWLETT PACKARD)にてN末端アミノ酸配列の解析を行った。

【0056】

目的タンパク質の内部鎖解析は、以下の方法で行った。ゲルからバンドを切り出し、50μlの0.1% SDS、1 mM EDTA、0.1 M Tris-HCl(pH 9.0)に浸漬し、リジンに特異的なプロテアーゼ(リジルエンドペプチダーゼ、Achromobacter protease I)を加え、37℃一晩消化した。消化液をDEAE-5PW(1 x 20 mm; Tosoh, Tokyo)とMightysil RP-18(1 x 50 mm; Kanto Chemical, Tokyo)の連結カラムで分離した。溶媒として、Aには、0.085% TFA aq. Bには、0.075% TFA、80% CH₃CN. Aqを用い、1-12.5-60% B/1-10-86min. 20 μl/minで溶出した。溶出ピークは、ペプチドシーケンサー及びMALDI-TOF MSでアミノ酸配列解読及び質量分析を行った。その結果、精製目的タンパク質の32残基のN末端アミノ酸配列と、リシルエンドペプチダーゼ処理により4ヶ所の内部鎖アミノ酸配列が同定された。

【0057】

SDS電気泳動で検出された75kDa、55kDaの2つのバンドはいずれも、¹²⁵I標識した(GlcNAc)₈-APEA誘導体で親和性標識され、N末端アミノ酸配列が同一であった。さらに、リジンを特異的に切断するプロテアーゼによるペプチドマップの解析から、低分子量のバンドは75kDaタンパク質のC末端側が精製中に内在性のプロテアーゼで部分分解されたものと考えられた。

【0058】

上述のように、キチンオリゴ糖をそのまま固定化するのではなく、APEA誘導体として固定化する方法の開発によりカラム担体の吸着容量が大幅に向上し、操作条件全体の検討と併せると初期の方法に比べ20倍近い収率の向上につながった。最終的に設定された条件下では、原形質膜に存在するエリシター結合タンパク質の約1.6%が回収されたものと推定される。この場合には精製過程で人為的にN末端アミノ酸残基を修飾することも無く、また、収率の向上もあって、32残基のN末端アミノ酸配列を解読できた。また、このことにより特定のペプチド分解酵素で特異的に切断されたペプチドを分離・精製し、その解析から4つの内部鎖アミノ酸配列を解読することができた。

【0059】

(実施例2) 抗Con A-CEBiP抗体の調製と精製

CEBiPは、コンカナバリンA(Con A)に結合する糖タンパク質である。そこでCon Aカラムに結合するイネ原形質膜画分に対する抗血清を作成し、種々のクロマトグラフィーを用いて、抗原可溶化したイネ原形質膜画分中のCon Aに結合する全タンパク質を調製した。これを抗原として、ウサギを免疫し、抗Con A-bound fra. 抗血清を得た。

【0060】

抗Con A-CEBiP抗血清の調製は以下の手順で行った。Con A-Sepharoseカラムを用いて、抗原可溶化したイネ原形質膜画分中のCon Aに結合する全タンパク質を調製した。これを抗原として、ウサギを免疫し、抗Con A-bound fra. 抗血清を得た。

【0061】

この抗血清を以下の方法で精製を行った（図2）。イネ原形質膜画分から(GlcNAc)₇-Lys-Sepharoseを通過した画分及び非エリシター糖（キトサンヘキサオース及びセロヘキサオース）で溶出した画分をそれぞれ固定化したカラムを調製した。抗Con A-bound fra. 抗血清を両カラムで分画し、抗Con A-CEBiP抗体を得た。

【0062】

抗Con A-CEBiP抗体の純度を確かめるために、Con Aカラムに結合したイネ原形質膜画分を¹²⁵Iで標識したエリシター糖でアフィニティーラベルしたのち、2次元電気泳動に展開

後、PVDF膜に転写した。転写膜上で抗Con A-CEBiP抗体を用いてWestern Bolttingを行った。その後、同膜上にある放射性ラベルされたタンパク質を、バイオイメージングアナラタ（BAS 2000、富士フィルム）で解析した。放射能ラベルされたタンパク質とWestern Boltting解析により発色したタンパク質が同一であるかどうかを確かめた。分子量スタンダードには、レインボータンパク質スタンダード（アマシャム社）及びプレシジョンプロテインスタンダード（BIO-RAD）を用いた。

【0063】

その結果、Western Bolttingで検出された3つのスポットのうち主要な2つは、放射性標識されていた（図3）。このことは、抗Con A-CEBiP抗体が、CEBiPに対して高度に精製されたことを示した。

【0064】

（実施例3）抗血清による活性酸素生成応答の阻害解析

イネ培養細胞からプロトプラストを調製し、抗ConA-CEBiP抗体のエリシター応答性活性酸素生成への影響を調べた。

【0065】

イネプロトプラストは以下の方法で調整した。

金網で裏ごし4日目のイネ培養細胞を2%Cellulase RS (Yaklt) 及び0.05% Pectolyase Y-23を含む0.1% CaCl₂, 0.02% MES, 9% Mannitol溶液 (pH 5.6) 14 ml中で、30°C, 6 m、5分間の遠心で回収した。Washing buffer(0.1% CaCl₂/0.4 M Mannitol)で洗った (Nishimura, N., Tanabe, S., He, D.-Y., Yokota, T., Shibuya, N. and Minami, E. Plant Physiol. Biochem., 39, 1105-1110 (2001))。50 mlのファルコンチューブに集めたプロトプラストを600 rpm、5分間の遠心で回収した。Washing bufferを加え、数回プロトプラストを洗浄したのち、適量のR2P培地に懸濁し、トーマ血球盤でプロトプラスト数を調べた。プロトプラストは、2x10⁶ cells/mlに調整後、25°C、暗所にて一晩保温した。

【0066】

イネプロトプラストにおける活性酸素の生成は、ルミノール法 (Schwacke, R. and Hager, A. Planta, 187, 136-141(1992))により行った。反応後の溶液は測定まで氷中に保存した。ルミノール、フェリシアン化カリウムは50 mM カリウムリン酸バッファー pH 7.9を溶媒とした。フェリシアン化カリウムは使用直前に調製し、ルミノール溶液は低温で遮光保存していたものを使用前に室温に戻して用いた。

【0067】

イネプロトプラスト (1x10⁶ cells/500 μl) を2 mlチューブに入れ、免疫前(Preimmune)抗血清或いは抗Con A-CEBiP抗体で30分間反応させた後、((GlcNAc)₈、100 μg/ml) 1 μlあるいはR2P培地を加え15分間ゆっくり攪拌後、1000 rpm、1分間、遠心分離し、上清部を得た。また、同濃度のプロトプラストにR2P培地あるいは(GlcNAc)₈ 1 μlを加えたものをコントロールとした。

【0068】

チューブで反応後の溶液25 μl、50 mMカリウムリン酸バッファー (pH 7.9) 400 μl、1.1 mM ルミノール 25 μl、14 mM フェリシアン化カリウム50 μlを攪拌した後に、すばやくルミノメーター (Turner Design TD-20/20、Sunnyvale CA) にて10秒間化学発光カウントを測定した。H₂O₂濃度は、市販H₂O₂溶液 (30% H₂O₂水溶液、和光純薬) による発光を測定し、標準曲線を作成して算出した。

【0069】

プロトプラストにGlcNAcを添加すると、コントロールに比べて活性酸素の生成が1.7倍に増加した。この増加は、免疫前ウサギ血清では、阻害されないが、抗Con A-CEBiP抗体で前処理することによりほぼ完全に阻害された（図4）。

【0070】

これらの結果は、本タンパク質がキチンオリゴ糖エリシターの受容体タンパク質であることを強く示唆するものであった。

[0 0 7 1]

(実施例4)イネcDNAライブラリー中のCEBiPのスクニーリング

(実施例4) イネcDNAライブラリーの調製
イネ(日本晴)培養細胞からフェノール・SDS法とオリゴdT法でPolyA RNA(mRNA)を単離し、これを鋳型としてZAP-cDNA合成キット(STRATAGENE)にてイネ培養細胞cDNAライブラリーを調製した。

[0072]

本発明のタンパク質の遺伝子クローニングに関しては、いくつかのアプローチにより検討を行った。N末端アミノ酸15残基の配列に対する抗ペプチド抗体を作製し、抗体を高純度に精製したのち、イネ培養細胞cDNAライブラリーのスクリーニングを試みたが、目的タンパク質を含むクローニングを単離することが出来なかった。その原因として第一に、15残基アミノ酸配列情報では特異性が不十分であり、イネ培養細胞中にこの抗体と反応する他のタンパク質が（膜画分以外に）存在することが考えられる。精製抗ペプチド抗体はミクロンゾーム画分及び原形質膜画分を用いる限りでは单一バンドを示す目的タンパク質とのみ反応したが、イネcDNAライブラリーをスクリーニングして得た陽性クローニングは受容体とは異なる既知のタンパク質と類似した配列を持っていた。このほか、この方法では目的タンパク質が大腸菌中でシグナルペプチドを含んだ形で合成されるため、立体障害の問題からこの抗ペプチド抗体と反応することが困難である可能性も考えられる。

【0073】

このほか、デジエネレーテッドオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、イネ培養細胞mRNAから作製した環状一本鎖DNAや、ゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行う方法も検討したが、多くのバンドが増幅され、サブクローニングが困難であった。また、このオリゴヌクレオチドをプローブとして直接ライブラリーのスクリーニングを行う方法も試みたが、非特異的なスポットが多く見られ、陽性クローンの単離に至らなかった。

[0 0 7 4]

そこで、本発明者らは、イネ（日本晴）の使用頻度の高いコドンを組み合わせた7残基のN末端アミノ酸配列（¹⁴KSAILYT／配列番号：10（逆向き））に対応する上流向きプライマーを72種類合成し、イネ培養細胞cDNAライブラリーを鋳型とし、それぞれの合成プライマーとベクター上にある既知のプライマーでPCRを行った（図5、6）。合成プライマーとベクターのReverse primer（GGAAACAGCTA TGACCATG／配列番号：12）でPCRを行なった結果、目的アミノ酸配列に対応するPCR増幅産物を得ることに成功した。得られたPCR断片をTAベクター（TA cloning kit, Invitrogen）にサブクローニングし、PCR断片の配列を解読した。このときに得られたPCR断片の大きさは280bpであり、翻訳されたタンパク質の配列は、シグナルペプチドの前の残基、Tからはじまり49アミノ酸残基であった。

【0075】

目的タンパク質のN末端アミノ酸配列に対応するDNAをプラスミドから切り出し、これをプローブとして、147bpのプローブでイネ培養細胞cDNAライブラリー (4×10^5 pfu) から目的遺伝子をスクリーニングした。

〔0076〕

その結果、N末端アミノ酸配列が合致する3つのcDNAクローニングを単離した。これら3種のクローニングは、いずれも目的タンパク質のN末端アミノ酸配列と完全に一致する配列を含んでいた。このmRNAは、28アミノ酸残基のシグナルペプチド (M-28からA-1) 及びC末端側に22アミノ酸残基の推定膜貫通領域 (A 307からL 328) を含んでいた (図7)。

【0077】

(実施例5)ゲノミックサザンプロット分析

目的遺伝子のコピー数を調べるため、イネから単離したゲノムDNAを各種の制限酵素で処理、アガロースゲルによる電気泳動後、目的タンパク質をコードするDNAをプローブとして、ゲノミックサザンプロット分析を行った。その結果、数種の制限酵素処理したゲノムDNAでシングルバンドが検出され（図8）、目的とするエリシター結合タンパク質遺伝子はシングルコピーであることが示唆された。

【0078】

このことはまた、目的タンパク質をコードするmRNAとN末端配列を共有する低分子量タンパク質をコードするものが、いずれもこの単一遺伝子からスプライシング等の差異によって生成する可能性を示唆している。

【0079】

(実施例6)イネゲノムライブラリー中のCEBiPのスクニーリング

イネゲノムライブラリーをプローブ1(図7におけるA1からT181のアミノ酸配列部分に対応するDNA断片)でスクリーニングした結果、いくつかの陽性クローンを単離することができた。この中で、もっとも鎖長の長い陽性クローンからDNAを単離し、制限酵素で切断後、それぞれをプラスミドベクターに導入し、全長13,095bpの配列を決定した。この配列中には、目的タンパク質部分が完全にコードされていた。その後、イネゲノムデータベース検索から本発明者らが解析したゲノムDNAを含む遺伝子(AC099399)が見つかり、この遺伝子が第3染色体に座乗していることが確かめられた。このタンパク質の配列とゲノムDNA配列とを照合した結果、この部分のゲノムDNA配列には3箇所のイントロンが存在し(図9)、これらのイントロンのスプライシングによりCEBiPの成熟mRNAが合成されることが明らかとなった。

【0080】

また、この目的遺伝子の発現は、キチンオリゴ糖エリシターにより誘導されることが確認された(図10)。

【0081】

この目的遺伝子の翻訳産物の解析から、キチンエリシター結合タンパク質はC末端側にアミノ酸22残基からなる膜貫通領域を含むアミノ酸328残基からなり、分子量34640であった。また、11ヶ所の糖鎖結合可能なサイト(NXT(S))のうち、ペプチドシーケンス解析によりこれまで4ヶ所に糖鎖が付加していることが推測された。また、モチーフ検索から、ペプチドグリカン結合タンパク質に存在するLysMドメインが2ヶ所(図7におけるY85～P131(配列番号：4の85番目から131番目までの配列)及びY149～P192(配列番号：4の149番目から192番目までの配列))あることが明らかになった。

【0082】

この目的タンパク質の分子量は、最初に¹²⁵I標識したエリシター糖によるアフィニティーラベルで得られた75kDaのタンパク質と分子量がかけ離れていた。すでに本発明者らは、Multiphor IIマルチバーパス電気泳動装置で、プレキャスト型のポリアクリルアミド濃度8-18%グラジエントゲル(Pharmacia)を用いた電気泳動では、目的タンパク質が7万5千に検出されるが、一方、ATT0のスラブ電気泳動装置を用いたものでは、6万5千から6万7千に検出されることを報告している(Okada, M., Matsumura, M., and Shibuya, N., J Plant Physiol. 158, 121-124 (2001))。これまで使用していたレインボータンパク質スタンダードは非常にブロードであり、より正確なコンビナントタンパク質で調製された分子量スタンダードを使用すると、これまで65kDaから67kDaであった目的タンパク質は56kDaであった。さらに、より正確なCEBiPの分子量を測定するために、MALDI TOF-MS(Bruker Reflex)を用いた。その結果、主として、40kDa及び35kDaの2つのピークを得た(図11)。これらの分子量の差は、CEBiPへの付加糖鎖の差によるものと考えられた。

。

【0083】

(実施例7)TFMS処理によるCEBiP糖鎖の除去

遺伝子から算出される分子量と、電気泳動により推定した分子量の差は、糖鎖付加によるものかどうかを確かめるために、トリフルオロメタンスルホン酸(TFMS)によりイネ原形質膜タンパク質中の糖タンパク質の糖鎖を化学的に切断し、SDS-PAGEに続いてWestern Blottingを行ったのち、抗CEBiP抗血清による目的タンパク質の検出を行った。

【0084】

抗CEBiP抗血清は以下の方法で作製した。

まず、大腸菌大量発現系においてCEBiPを発現させた。具体的には、目的タンパク質か

ら膜貫通領域を除いた領域に対応するcDNA断片をPCRで調製し、それをポリヒスチジン標準ベクターであるpET16bに挿入したのち、配列を確認した。該cDNA断片の塩基配列を配列番号：7に、cDNAをコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：8に示す。これを大腸菌BL21に導入し、200μg/mlのカルベニシリンを含むLB培地で37℃にて4時間半培養を行った。遠心分離により大腸菌を集め、同濃度のカルベニシリンを含むLB培地1mlに再懸濁させた後、50μlをカルベニシリン（最終濃度500μg/ml）を含む8mlのLB培地に添加し3時間培養を行った。遠心分離により大腸菌を集め、カルベニシリン（最終濃度500μg/ml）を含む8mlのLB培地に再懸濁させ、IPTG（最終濃度1mM）を加え、30℃、2時間培養を行ったのち、遠心分離（10000rpm、20℃）で菌体を回収し、-80℃にて保存した。

【0085】

次に、CEBiPを発現する菌体をPBSに懸濁したのち、ソニックで破碎し、遠心分離により沈殿画分を得た。この沈殿画分をSDS電気泳動を行った。発現タンパク質を含むゲルバンドを切り出し、PBSを加え、乳鉢で粉碎後、4℃で一晩攪拌し、目的タンパク質を抽出した。これを抗原として、ウサギに免疫を行い、抗CEBiP抗血清を得た。

【0086】

TFMS処理および目的タンパク質の検出は以下の方法で行なった。
イネ原形質膜画分（20μg）をねじ口瓶に入れ、十分に乾燥させたのち、トリフルオロメタンスルホン酸（TFMS）50μlに溶解させ、0℃、1時間静置した。反応液に氷冷した1M Trisを500μl加え中和したのち、チューブに275μlずつ分注し、27.5μlの5M NaCl及び1.2mL MeOHを加え、-80℃で、一晩放置後、遠心分離して、沈殿画分を得た。この沈殿画分をSDS電気泳動、Western Blottingに供し、抗CEBiP抗血清で目的タンパク質の検出を行った。

【0087】

その結果、33kDa付近に陽性バンドが認められた（図12）。この分子量は、遺伝子から算出される値とよく一致していた。

【0088】

岡田らは、イネの葉や根の原形質膜にCEBiPと同一と考えられる結合タンパク質を見いだした（Okada, M., Matsumura, M., and Shibuya, N., J Plant Physiol. 158, 121-124 (2001)）。キチンオリゴ糖がリグニン化を誘導することが報告されているコムギの葉から得た原形質膜においても同様のキチンオリゴ糖結合タンパク質が見いだされたが分子サイズは若干異なっていた。種々の植物の培養細胞を調べた結果、オオムギ、ニンジンなどの培養細胞の原形質膜に同様の結合タンパク質が見いだされた（Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y., and Shibuya, N., Plant Cell Physiol., 43, 505-512 (2002)）。これらのことは、こうしたキチン系エリシター認識系がイネに特有のものではなく、多くの植物に存在する進化的に保存されたものであることを示唆している。

【0089】

本遺伝子情報が明らかになることは、植物が病原菌由来のシグナル分子（エリシター）を認識し、細胞内・細胞間シグナル伝達経路を経て生体防御関連遺伝子の発現を誘導するメカニズムを明らかにすることが期待され、病害に強い作物の育種や新規な病害防除技術の開発に寄与することが考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0090】

【図1】イネ培養細胞からのキチンエリシター結合タンパク質の精製を示す図及び写真である。

【図2】抗Con A-CEBiP抗体の精製方法を示す図である。

【図3】アフィニティーラベルしたCon Aに結合するイネ原形質膜画分を2次元SDS-PAGEの結果を示す写真である。

【図4】活性酸素生成における抗CEBiP抗体又は抗血清の効果を示すグラフである。

【図5】ペプチドシーケンサーから得たN末端32残基アミノ酸配列を示す図である。

【図6】オリゴキチン結合タンパク質のクローニングの概略図である。

【図7】イネ由来キチンエリシター結合タンパク質のcDNAを示す図である。図中の塩基配列を配列番号：5、アミノ酸配列を配列番号：6に示す。

【図8】ゲノミックサザンプロット分析の結果を示す写真である。

【図9】キチンエリシター結合タンパク質の配列とゲノムDNAの配列の照合結果を示す図である。

【図10】可溶化培養細胞における(GlcNAc)₇のCEBiPの発現への影響を示す写真である。

【図11】MALDI TOF-MSによるCEBiPの分子量の測定結果を示す図である。

【図12】TFMSによるCEBiPの糖鎖除去を示す写真である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Agrobiological Sciences
RIKEN

<120> N-Acetylchitooligosaccharide elicitor binding protein

<130> MOA-A0402

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1071

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1071)

<223>

<400> 1

atg gcg tcg ctc acc gcc gcc ctg gcc acg ccg gcg gcc gct gcc ctc
Met Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ala Thr Pro Ala Ala Ala Leu
1 5 10 15

48

ctc ctc ctc gtc ctc gcc ccc gcc tcc gcc gcc aac ttc acc
Leu Leu Leu Val Leu Leu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Ala Asn Phe Thr
20 25 30

96

tgc gcg gtg gct tca ggc acc acc tgc aag tcc gcc atc ctc tac acc
Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala Ile Leu Tyr Thr
35 40 45

144

tcc ccc aac gcc acc acc tac ggc aac ctc gtc gcc cgc ttc aac acc
Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala Arg Phe Asn Thr
50 55 60

192

acc acc ctc ccc gac ctc ggc aac ggc ctc ccc gac ggc acg
Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu Pro Asp Gly Thr
65 70 75 80

240

ctt tcc tcc gcc ccc gtc gcc aat tcc acc gtc aaa atc ccc ttc
Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val Lys Ile Pro Phe
85 90 95

288

cgc tgc cgc tgc aac ggc gac gtc ggc cag tcg gac cgc ctc ccc atc

336

Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp Arg Leu Pro Ile			
100	105	110	
tac gtc gtg cag ccg cag gac ggg ctc gac gcc atc gcg cgcc aac gtg			384
Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile Ala Arg Asn Val			
115	120	125	
ttc aac gcc ttc gtc acc tac cag gag atc gcc gcc gcg aac aac atc			432
Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala Asn Asn Ile			
130	135	140	
ccc gac ccc aac aag ata aat gtc agc cag acg ctg tgg att ccg ctg			480
Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu Trp Ile Pro Leu			
145	150	155	160
ccc tgc agc tgc gac aag gag gaa ggc tct aac gtg atg cac ctc gcc			528
Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val Met His Leu Ala			
165	170	175	
tac agc gtc ggc aaa ggg gag aac acg tcg gcc atc gct gcc aag tac			576
Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile Ala Ala Lys Tyr			
180	185	190	
ggg gtg acg gag tcc acg ctt ctc acc aga aat aag atc gac gac ccc			624
Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys Ile Asp Asp Pro			
195	200	205	
acg aaa ttg cag atg gga cag att cta gat gtc ccg ctc cct gtg tgc			672
Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro Leu Pro Val Cys			
210	215	220	
cgt tca tca atc agc gat acc tca gct gat cac aat ctg atg ctc ctc			720
Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn Leu Met Leu Leu			
225	230	235	240
ccg gat ggc acc tat gga ttc acc gca gga aac tgc atc cgc tgc agc			768
Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys Ile Arg Cys Ser			
245	250	255	
tgc agt tca act acc tac cag cta aac tgc act gca gta cag aac aag			816
Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala Val Gln Asn Lys			
260	265	270	
gga tgc ccg tca gtg cca ctg tgc aat gga acg ctg aag ctt ggt gag			864
Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu Lys Leu Gly Glu			
275	280	285	
acg aac ggc acc ggt tgc gga tca aca acg tgc gcc tac agt ggt tac			912
Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala Tyr Ser Gly Tyr			
290	295	300	

tcc aac agt tca tcg ctc atc ata caa acc acc ctt gca act aat cag	960
Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu Ala Thr Asn Gln	
305 310 315 320	
aca aca gcc tgc cag aga gga gga tct ggg agg tcg cag ttc gct agg	1008
Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Ser Gly Arg Ser Gln Phe Ala Arg	
325 330 335	
tcc atg tgg agc atg tct gtt atc tcc ttc cac atg gtg ttg atc att	1056
Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met Val Leu Ile Ile	
340 345 350	
atc tgt ttc ctt tga	1071
Ile Cys Phe Leu	
355	

<210> 2
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 2
 Met Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ala Thr Pro Ala Ala Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Leu Leu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Ala Asn Phe Thr
 20 25 30

Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala Ile Leu Tyr Thr
 35 40 45

Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala Arg Phe Asn Thr
 50 55 60

Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu Pro Asp Gly Thr
 65 70 75 80

Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val Lys Ile Pro Phe
 85 90 95

Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp Arg Leu Pro Ile
 100 105 110

Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile Ala Arg Asn Val
 115 120 125

Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala Asn Asn Ile
 130 135 140

Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu Trp Ile Pro Leu
 145 150 155 160
 Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val Met His Leu Ala
 165 170 175
 Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile Ala Ala Lys Tyr
 180 185 190
 Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys Ile Asp Asp Pro
 195 200 205
 Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro Leu Pro Val Cys
 210 215 220
 Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn Leu Met Leu Leu
 225 230 235 240
 Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys Ile Arg Cys Ser
 245 250 255
 Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala Val Gln Asn Lys
 260 265 270
 Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu Lys Leu Gly Glu
 275 280 285
 Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala Tyr Ser Gly Tyr
 290 295 300
 Ser Asn Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu Ala Thr Asn Gln
 305 310 315 320
 Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser Gln Phe Ala Arg
 325 330 335
 Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met Val Leu Ile Ile
 340 345 350
 Ile Cys Phe Leu
 355

<210> 3
 <211> 987
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<220>

出証特2005-3035368

<221> CDS

<222> (1)..(987)

<223>

<400> 3

gcc aac ttc acc tgc gcg gtg gct tca ggc acc acc tgc aag tcc gcc	48
Ala Asn Phe Thr Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala	
1 5 10 15	

atc ctc tac acc tcc ccc aac gcc acc acc tac ggc aac ctc gtc gcc	96
Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala	
20 25 30	

cgc ttc aac acc acc ctc ccc gac ctc ctc ggc gcc aac ggc ctc	144
Arg Phe Asn Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu	
35 40 45	

ccc gac ggc acg ctt tcc tcc gcc ccc gtc gcc gcc aat tcc acc gtc	192
Pro Asp Gly Thr Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val	
50 55 60	

aaa atc ccc ttc cgc tgc cgc tgc aac ggc gac gtc ggc cag tcg gac	240
Lys Ile Pro Phe Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp	
65 70 75 80	

cgc ctc ccc atc tac gtc gtg cag ccg cag gac ggg ctc gac gcc atc	288
Arg Leu Pro Ile Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile	
85 90 95	

gcg cgc aac gtg ttc aac gcc ttc gtc acc tac cag gag atc gcc gcc	336
Ala Arg Asn Val Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala	
100 105 110	

gcg aac aac atc ccc gac ccc aac aag ata aat gtc agc cag acg ctg	384
Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu	
115 120 125	

tgg att ccg ctg ccc tgc agc tgc gac aag gag gaa ggc tct aac gtg	432
Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val	
130 135 140	

atg cac ctc gcc tac agc gtc ggc aaa ggg gag aac acg tcg gcg atc	480
Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile	
145 150 155 160	

gct gcc aag tac ggg gtg acg gag tcc acg ctt ctc acc aga aat aag	528
Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys	
165 170 175	

atc gac gac ccc acg aaa ttg cag atg gga cag att cta gat gtc ccg	576
---	-----

Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro
 180 185 190

ctc cct gtg tgc cgt tca tca atc agc gat acc tca gct gat cac aat 624
 Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn
 195 200 205

ctg atg ctc ctc ccg gat ggc acc tat gga ttc acc gca gga aac tgc 672
 Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys
 210 215 220

atc cgc tgc agc tgc agt tca act acc tac cag cta aac tgc act gca 720
 Ile Arg Cys Ser Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala
 225 230 235 240

gta cag aac aag gga tgc ccg tca gtg cca ctg tgc aat gga acg ctg 768
 Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu
 245 250 255

aag ctt ggt gag acg aac ggc acc ggt tgc gga tca aca acg tgc gcc 816
 Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala
 260 265 270

tac agt ggt tac tcc aac agt tca tcg ctc atc ata caa acc agc ctt 864
 Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu
 275 280 285

gca act aat cag aca aca gcc tgc cag aga gga gga tct ggg agg tcg 912
 Ala Thr Asn Gln Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser
 290 295 300

cag ttc gct agg tcc atg tgg agc atg tct gtt atc tcc ttc cac atg 960
 Gln Phe Ala Arg Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met
 305 310 315 320

gtg ttg atc att atc tgt ttc ctt tga 987
 Val Leu Ile Ile Ile Cys Phe Leu
 325

<210> 4
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 4
 Ala Asn Phe Thr Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala
 1 5 10 15

Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala

出証特 2005-3035368

20

25

30

Arg Phe Asn Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu
 35 40 45

Pro Asp Gly Thr Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val
 50 55 60

Lys Ile Pro Phe Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp
 65 70 75 80

Arg Leu Pro Ile Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile
 85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala
 100 105 110

Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu
 115 120 125

Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val
 130 135 140

Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile
 145 150 155 160

Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys
 165 170 175

Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro
 180 185 190

Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn
 195 200 205

Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys
 210 215 220

Ile Arg Cys Ser Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala
 225 230 235 240

Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu
 245 250 255

Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala
 260 265 270

Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu
 275 280 285

Ala Thr Asn Gln Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser
 290 295 300

Gln Phe Ala Arg Ser Met Trp Ser Met Ser Val Ile Ser Phe His Met
 305 310 315 320

Val Leu Ile Ile Ile Cys Phe Leu
 325

<210> 5
 <211> 1612
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 5	60
ttccatcggt aattttgaaa ttcatgtat tttttttctt ccaagtctga ctcaaacc	60
tcaattccac acaagttcac cattttctac ttgtatgcaa tcgaacccaa ggatagg	120
aggcccacgc tgcaaccatt taagtcgcca caagcactag catcgaggca tactc	180
cttccagtgt caacacgaca gtcaaacaaa caccaagcct ctcattccca cctctcgagg	240
agagctttcc ccaccatggc gtcgctcacc gccggccctgg ccacgcccggc ggccgctg	300
ctcctcctcc tcgtcctcctt cgccgcggcc gcctccggcc ccaacttcac ctgcgcgg	360
gttcaggca ccacctgcaa gtccggccatc ctctacaccc ccccaacgc caccac	420
ttcgacgcg tcgcccgtt caacaccacc accctccccg acctcctcgcc cgccaa	480
ccggccctcg ctccggccgc ctccggccgc attccaccgt caaaatcccc	540
ttccgctgccc gctgcaacgg cgacgtcgcc cagtcggacc gcctcccat ctacgtcg	600
caggccgcagg acgggctcgca cgccatcgcc cgcaacgtgt tcaacgcctt cgtcac	660
cgtatcgcc cggccgcgaa caacatcccc gaccccaaca agataaatgt cagccagac	720
ctgtggattc cgctgccctg cagctgcgac aaggaggaag gctctaacgt gatgcac	780
tcgcctcgcc gcctacagcg tcggcaaagg ggagaacacg tcggcgatcg ctgccaag	840
gtcgacgc ttctcaccag aaataagatc gacgacccca cggaaattgca gatgggac	900
attcttagatg tcccgctccc tgtgtgccgt tcatcaatca gcgataccctc agctgat	960
aatctgatgc tcctcccgga tggcacctat ggattcaccg caggaaactg catccgct	1020

agctgcagtt caactaccta ccagctaaac tgcactgcag tacagaacaa gggatgcccg	1080
tcagtgccac tgtcaatgg aacgctgaag cttggtgaga cgaacggcac cggttgcgga	1140
tcaacaacgt ggcctacag tggttactcc aacagttcat cgctcatcat acaaaccagc	1200
cttgcaacta atcagacaac agcctgccag agaggaggat ctgggagggtc gcagttcgct	1260
aggccatgt ggagcatgtc tggatctcc ttccacatgg tggatcat tatctgttc	1320
cttgatgtt ggagactact gcaactctag atggacatt tcaaagatgtt ctctacgatc	1380
tatgattgtt gtatacgata tatgattgtt gtcgtaactt agatttgtt gactggttta	1440
tccagcttg aaatttgagt ttgactctg ttcttagag gatgagtggc acttgtacgg	1500
ctgcttgaat aaaacgtcga tgtattgtat tcgatctgca tctgaaaagg aatattcatt	1560
agataggatt attcgaaata aaaagatccc acatgtttt gttaaaaaa aa	1612

<210> 6
 <211> 435
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 6
 Asn Phe Ser Asp Phe Leu Phe Ser Lys Ser Asp Ser Asn Gln Ser Ile
 1 5 10 15

Pro His Lys Phe Thr Ile Phe Tyr Phe Asp Ala Ile Glu Pro Lys Asp
 20 25 30

Arg Glu Arg Pro Thr Leu Gln Pro Phe Lys Ser Pro Gln Ala Leu Ala
 35 40 45

Ser Arg His Thr Pro Pro Ala Pro Val Ser Thr Arg Gln Ser Asn Lys
 50 55 60

His Gln Ala Ser His Ser His Leu Ser Arg Arg Ala Phe Pro Thr Met
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Thr Ala Ala Leu Ala Thr Pro Ala Ala Ala Leu Leu
 85 90 95

Leu Leu Val Leu Leu Ala Ala Pro Ala Ser Ala Ala Asn Phe Thr Cys
 100 105 110

Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala Ile Leu Tyr Thr Ser
 115 120 125

Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala Arg Phe Asn Thr Thr
 130 135 140

Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu Pro Asp Gly Thr Leu
 145 150 155 160

Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val Lys Ile Pro Phe Arg
 165 170 175

Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp Arg Leu Pro Ile Tyr
 180 185 190

Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile Ala Arg Asn Val Phe
 195 200 205

Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala Asn Asn Ile Pro
 210 215 220

Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu Trp Ile Pro Leu Pro
 225 230 235 240

Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val Met His Leu Ala Tyr
 245 250 255

Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile Ala Ala Lys Tyr Gly
 260 265 270

Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys Ile Asp Asp Pro Thr
 275 280 285

Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro Leu Pro Val Cys Arg
 290 295 300

Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn Leu Met Leu Leu Pro
 305 310 315 320

Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys Ile Arg Cys Ser Cys
 325 330 335

Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala Val Gln Asn Lys Gly
 340 345 350

Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu Lys Leu Gly Glu Thr
 355 360 365

Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala Tyr Ser Gly Tyr Ser
 370 375 380

Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu Ala Thr Asn Gln Thr

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Thr	Ala	Cys	Gln	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Arg	Ser	Gln	Phe	Ala	Arg	Ser
				405				410						415	

Met	Trp	Ser	Met	Ser	Val	Ile	Ser	Phe	His	Met	Val	Leu	Ile	Ile	Ile
					420			425					430		

Cys	Phe	Leu
	435	

<210> 7

<211> 918

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(918)

<223>

<400> 7

gcc	aac	ttc	acc	tgc	gct	gtg	gct	tca	ggc	acc	acc	tgc	aag	tcc	gcc
Ala	Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Val	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	Lys	Ser	Ala
1		5					10					15			

48

atc	ctc	tac	acc	tcc	ccc	aac	gcc	acc	acc	tac	ggc	aac	ctc	gtc	gcc
Ile	Leu	Tyr	Thr	Ser	Pro	Asn	Ala	Thr	Thr	Tyr	Gly	Asn	Leu	Val	Ala
		20					25			30					

96

cgc	ttc	aac	acc	acc	ctc	ccc	gac	ctc	ctc	ggc	gcc	aac	ggc	ctc	
Arg	Phe	Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	Asp	Leu	Leu	Gly	Ala	Asn	Gly	Leu	
		35			40			45							

144

ccc	gac	gac	acg	ctt	tcc	tcc	gcc	ccc	gtc	gcc	gcc	aat	tcc	acc	gtc	
Pro	Asp	Gly	Thr	Leu	Ser	Ser	Ala	Pro	Val	Ala	Ala	Asn	Ser	Thr	Val	
		50			55			60								

192

aaa	atc	ccc	ttc	cgc	tgc	cgc	tgc	aac	ggc	gac	gtc	ggc	cag	tcg	gac	
Lys	Ile	Pro	Phe	Arg	Cys	Arg	Cys	Asn	Gly	Asp	Val	Gly	Gln	Ser	Asp	
		65			70			75			80					

240

cgc	ctc	ccc	atc	tac	gtc	gtg	cag	ccg	cag	gac	ggg	ctc	gac	gcc	atc	
Arg	Leu	Pro	Ile	Tyr	Val	Val	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly	Leu	Asp	Ala	Ile	
		85			90			95								

288

gcg	cgc	aac	gtg	ttc	aac	gcc	ttc	gtc	acc	tac	cag	gag	atc	gcc	gcc	
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asn	Ala	Phe	Val	Thr	Tyr	Gln	Gl	Ile	Ala	Ala	
		100			105			110								

336

gcg aac aac atc ccc gac ccc aac aag ata aat gtc agc cag acg ctg Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu 115 120 125	384
tgg att ccg ctg ccc tgc agc tgc gac aag gag gaa ggc tct aac gtg Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val 130 135 140	432
atg cac ctc gcc tac agc gtc ggc aaa ggg gag aac acg tcg gcg atc Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile 145 150 155 160	480
gct gcc aag tac ggg gtg acg gag tcc acg ctt ctc acc aga aat aag Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys 165 170 175	528
atc gac gac ccc acg aaa ttg cag atg gga cag att cta gat gtc ccg Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro 180 185 190	576
ctc cct gtg tgc cgt tca tca atc agc gat acc tca gct gat cac aat Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn 195 200 205	624
ctg atg ctc ctc ccg gat ggc acc tat gga ttc acc gca gga aac tgc Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys 210 215 220	672
atc cgc tgc agc tgc agt tca act acc tac cag cta aac tgc act gca Ile Arg Cys Ser Cys Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala 225 230 235 240	720
gta cag aac aag gga tgc ccg tca gtg cca ctg tgc aat gga acg ctg Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu 245 250 255	768
aag ctt ggt gag acg aac ggc acc ggt tgc gga tca aca acg tgc gcc Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala 260 265 270	816
tac agt ggt tac tcc aac agt tca tcg ctc atc ata caa acc acg ctt Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu 275 280 285	864
gca act aat cag aca aca gcc tgc cag aga gga gga tct ggg agg tcg Ala Thr Asn Gln Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser 290 295 300	912
cag ttc	918

Gln Phe
305

<210> 8
<211> 306
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 8
Ala Asn Phe Thr Cys Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Cys Lys Ser Ala
1 5 10 15

Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Asn Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Leu Val Ala
20 25 30

Arg Phe Asn Thr Thr Leu Pro Asp Leu Leu Gly Ala Asn Gly Leu
35 40 45

Pro Asp Gly Thr Leu Ser Ser Ala Pro Val Ala Ala Asn Ser Thr Val
50 55 60

Lys Ile Pro Phe Arg Cys Arg Cys Asn Gly Asp Val Gly Gln Ser Asp
65 70 75 80

Arg Leu Pro Ile Tyr Val Val Gln Pro Gln Asp Gly Leu Asp Ala Ile
85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asn Ala Phe Val Thr Tyr Gln Glu Ile Ala Ala
100 105 110

Ala Asn Asn Ile Pro Asp Pro Asn Lys Ile Asn Val Ser Gln Thr Leu
115 120 125

Trp Ile Pro Leu Pro Cys Ser Cys Asp Lys Glu Glu Gly Ser Asn Val
130 135 140

Met His Leu Ala Tyr Ser Val Gly Lys Gly Glu Asn Thr Ser Ala Ile
145 150 155 160

Ala Ala Lys Tyr Gly Val Thr Glu Ser Thr Leu Leu Thr Arg Asn Lys
165 170 175

Ile Asp Asp Pro Thr Lys Leu Gln Met Gly Gln Ile Leu Asp Val Pro
180 185 190

Leu Pro Val Cys Arg Ser Ser Ile Ser Asp Thr Ser Ala Asp His Asn
195 200 205

Leu Met Leu Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Phe Thr Ala Gly Asn Cys

210

215

220

Ile Arg Cys Ser Cys Ser Ser Thr Thr Tyr Gln Leu Asn Cys Thr Ala
 225 230 235 240

Val Gln Asn Lys Gly Cys Pro Ser Val Pro Leu Cys Asn Gly Thr Leu
 245 250 255

Lys Leu Gly Glu Thr Asn Gly Thr Gly Cys Gly Ser Thr Thr Cys Ala
 260 265 270

Tyr Ser Gly Tyr Ser Asn Ser Ser Ser Leu Ile Ile Gln Thr Ser Leu
 275 280 285

Ala Thr Asn Gln Thr Thr Ala Cys Gln Arg Gly Gly Ser Gly Arg Ser
 290 295 300

Gln Phe
 305

<210> 9
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(30)
 <223> "Xaa" indicates any amino acid.

<400> 9
 Ala Xaa Phe Thr Xaa Ala Val Ala Ser Gly Thr Thr Xaa Lys Ser Ala
 1 5 10 15

Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Val Ala Thr Thr Tyr Gly Asn Xaa Val Ala
20 25 30

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 10
Thr Tyr Leu Ile Ala Ser Lys
1 5

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

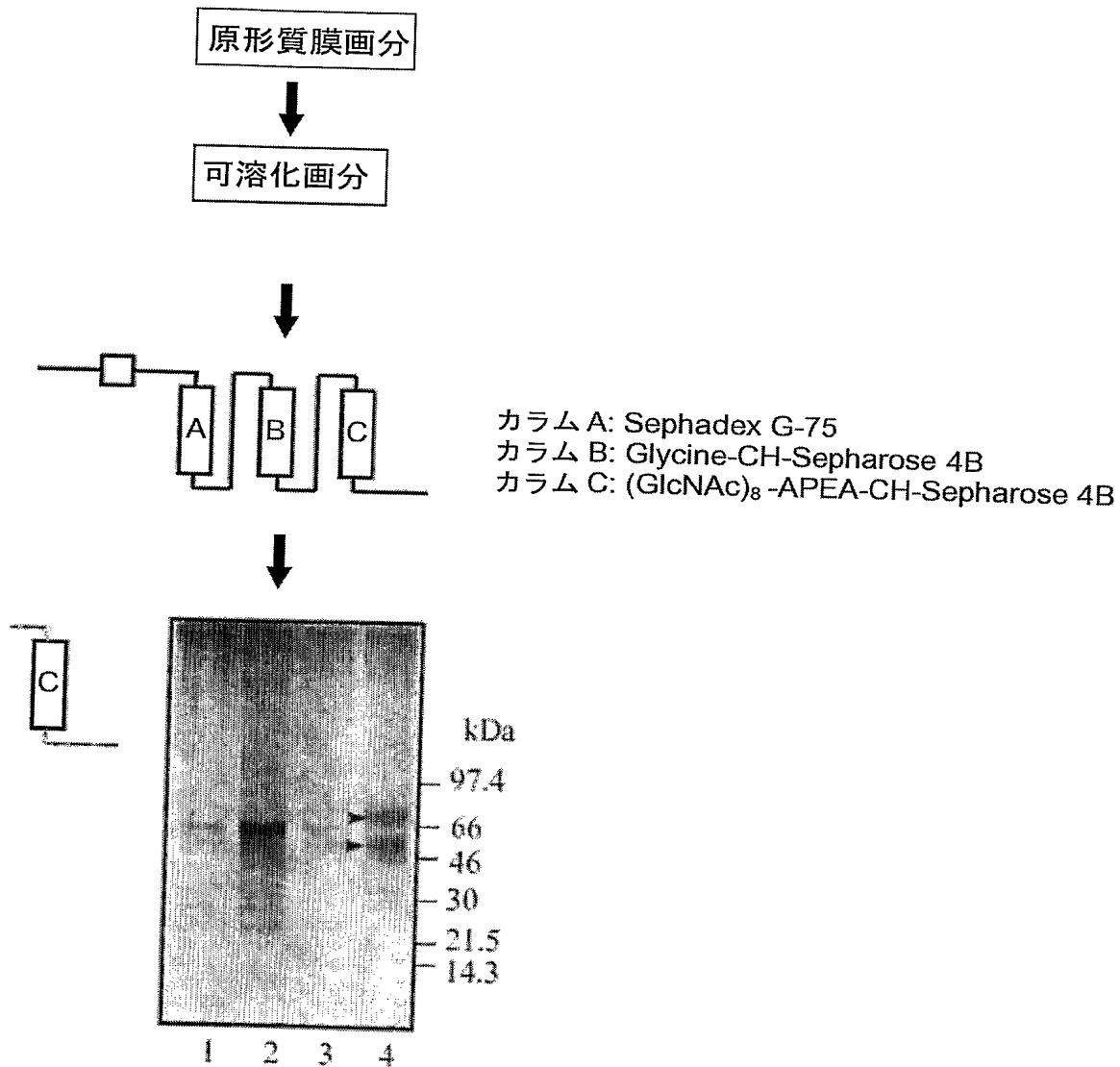
<400> 11
ttagaggat ggccggactt 19

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

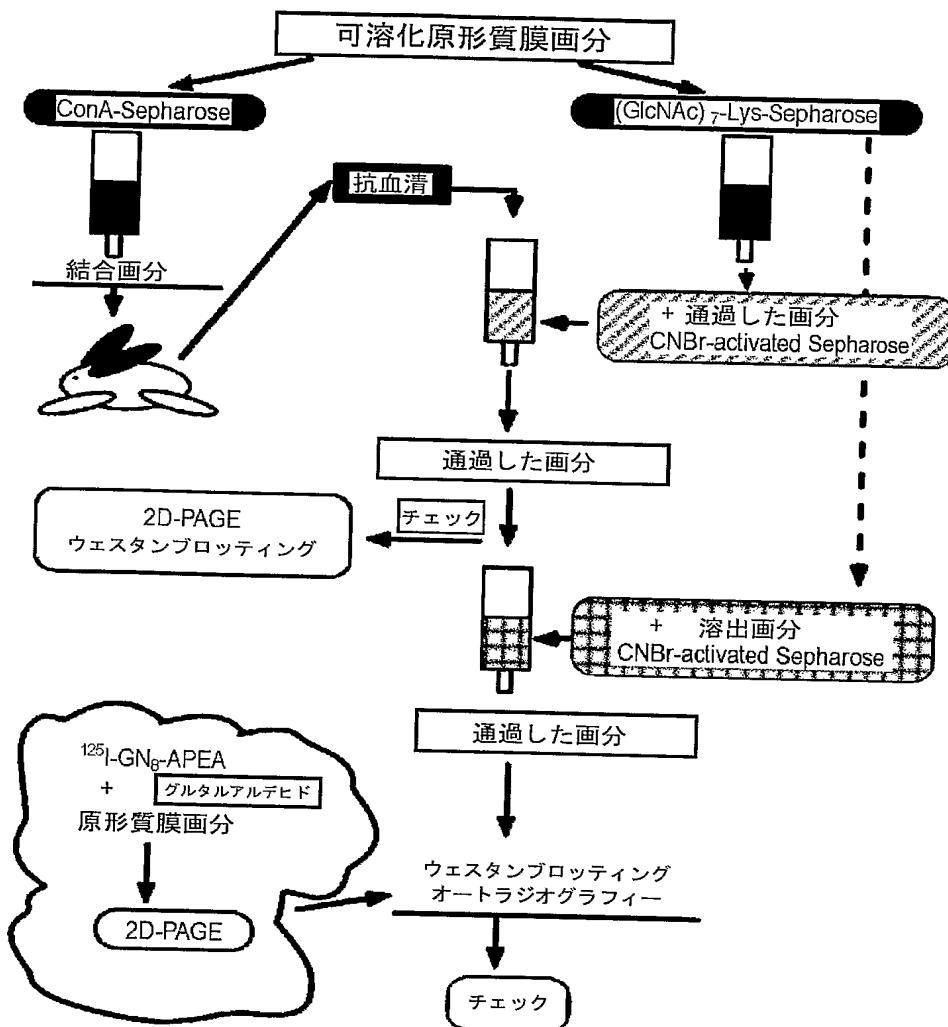
<220>
<223> An artificially synthesized primer sequence

<400> 12
ggaaacagct atgaccatg 19

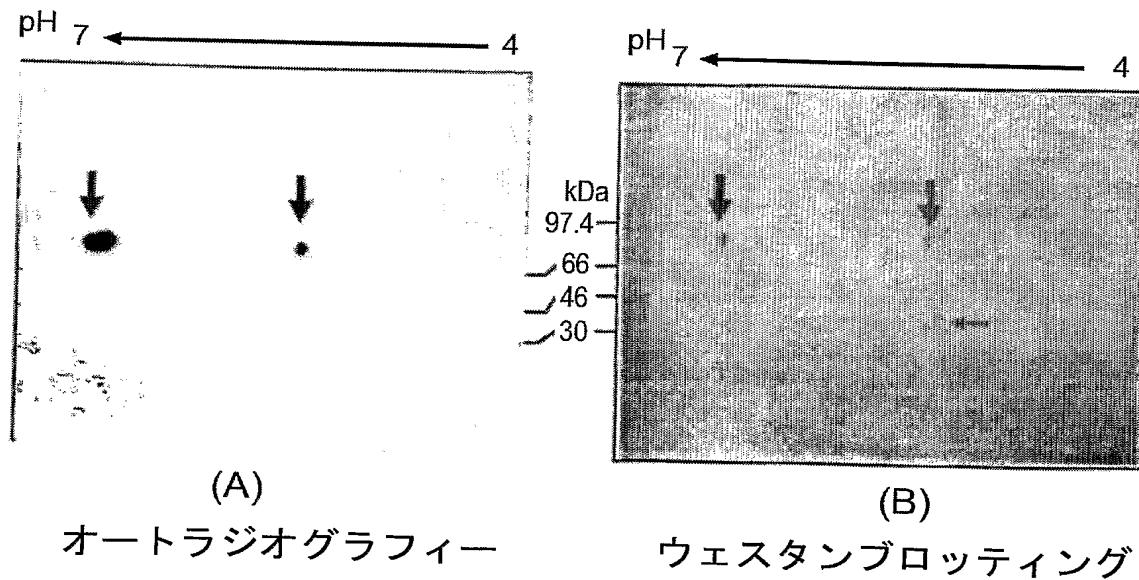
【書類名】 図面
【図 1】



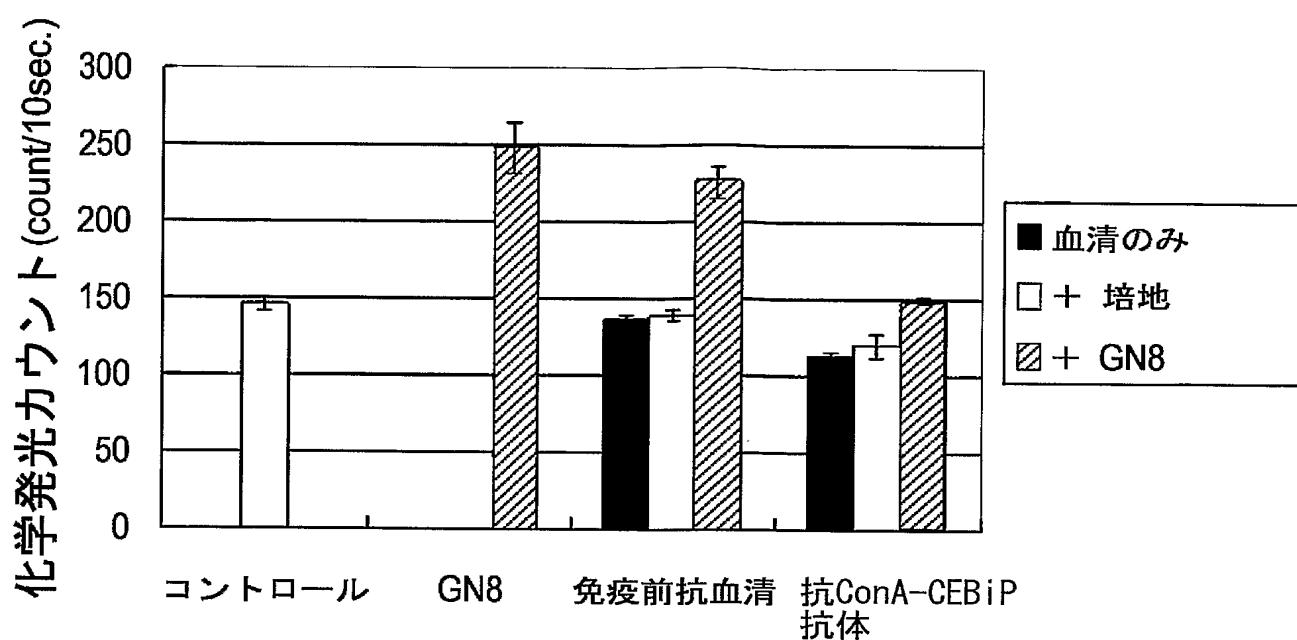
【図2】



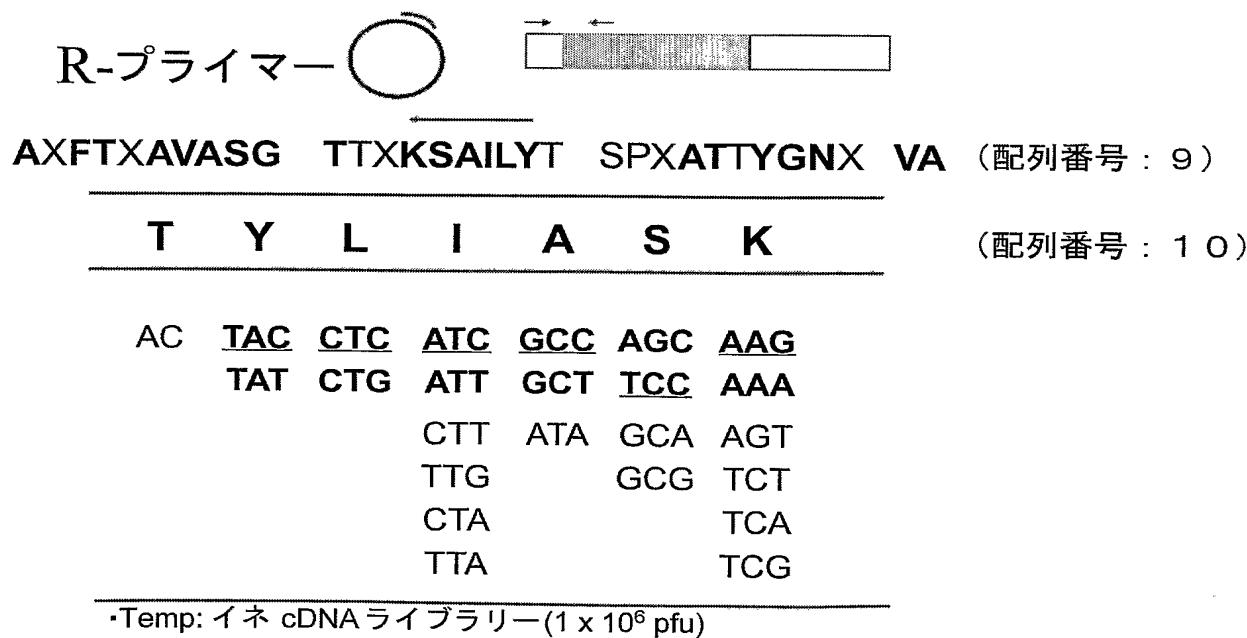
【図3】



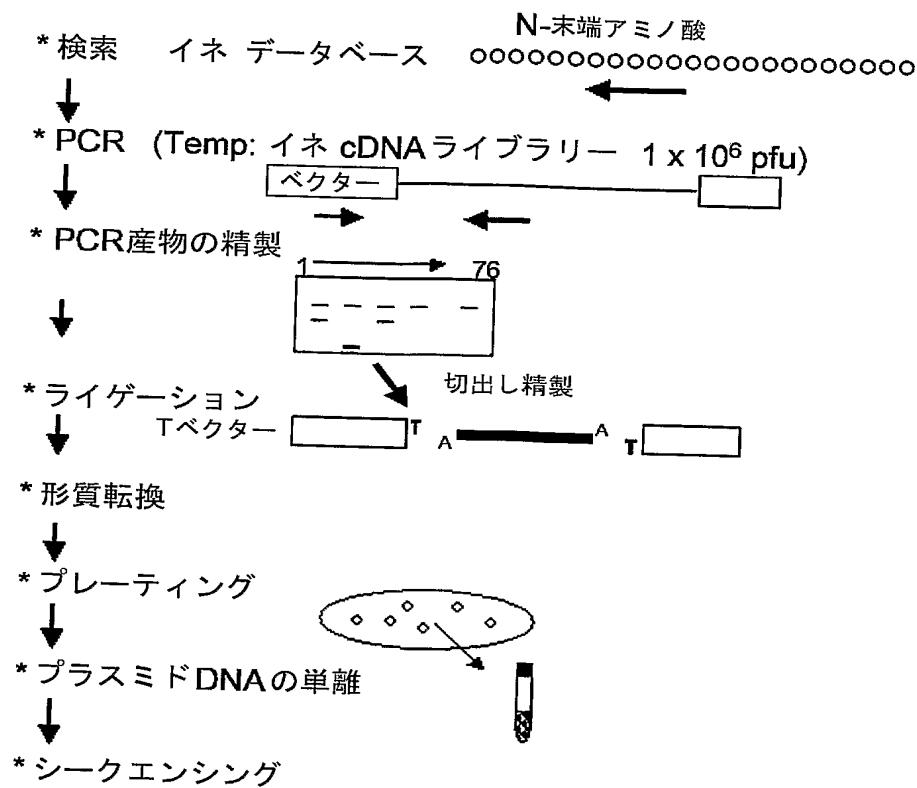
【図4】



【図5】



【図6】



【図7】

TTCCATCGGTAATTGAAATTCACTGATTTCAGTCAGTCTCAAGTCTGACCTAACCAATCAATTCCACACAGTTCACTTTCAGTTGATCAACGAAATCGAACACAAA
 F H R * F * N F S D F L F S K S D S N Q S I P H K F T I F Y F D A I E P K 110

GGATAGGAAAGGGCCACCGCTGCAACCACTTAAGTGCACAGGCAACTAGGATCGGGATTAACCTCTGCTCCAGTGTCAACACGACAGTCACAAACAAAGGCC
 D R E R P T L Q P F K S P Q A L A S R H T P P A P V S T R Q S N K H Q A S 220

CTCATCCACCTCTCGAGGAGGCCTCCACCATGGGCTCGCTCACCGCCGCCCTGGCCACGGGGGGCTGGCTCCCTCTCGTCTCTCGCCGCC
 H S H L S R R A F P T M A S L T A A L A T P A A A L L V L L V L A A P -4
 GCCCTGGCCGCGAACACTAACCTGGGGGGGGCTCAGGGACCAACCTGGAAAGTCCGCATCCCTCTACCCCTCCCAACGCCACCACTACGGAAACCTCGTCC
 A S A A N F T C A V A S G T T C K S A I L Y T S P N A T T Y G N L V A R F 330
 CAACACCAACCCCTCCCGACACTCTGGGCCAACGGCTCCCGACGGCACGGTTCTCCGGCCCGTGGCCCGCAATCCGCTAAATCCGCTTCCGGTGGC
 N T T T L P D L L P D G T L S S A P V A A N S T V K I P F R C R 34
 GCTGCAACGGGACGGCCAGTCGGACGGCTCCCACTCTACGTCGTGAGGGCTGAGGGCTGAGGGCTGAGGTGTTCAACGGCTTCTGTCACCTAC 440
 C N G D V G Q S D R L P I Y V V Q P Q D G L D A I A R N V F N A F V T Y 550
 CAGGAGATCGCCGGCGAACACATCCCGACCCAAACAAGATAATGTCGGAGACCCCTGGATTCCGGCTGCCCTGGAGCTGGCAAGGGAGGCTAACGT
 Q E I A A A N N I P D P N K I N V S Q T L W I P L P C S C D K E E G S N V 71
 GATGCAACTCGGCTACAGGGCTGGCAAGGGGAAACACGTCGGGATTCGGTGGCAAGTAGCGGGTACGGGTTACGGAGTCCACGGTTCTACAGGAA
 M H L A Y S V G K G E N T S A I A A K Y G V T E S I L L T R N K I D D P T 660
 CGAAATTGCGAGATGGGACAGATTCTAGATGTCGGCTCCCTGGTGGCTCATCAATCAGGGATACCTCACTGATCAATCTGATGGCACCCTAT 80
 K L Q M G Q I L D V P L P V C R S S I S D T S A D H N L M L P D G T Y 181
 GGATTCAACCGAGGAACACTGGCATCCGGTGCAGTCAACTACCTACCAAGCTAAACTGGACTGCAGTACAGAACAGGGATGCCACTGTGCAATGG
 G F T A G N C I R C S C S S T T Y Q L N C T A V Q N K G C P S V P L C N G 1100
 AACGGCTGAAGCTGGTAGACGGAACGGCACCGGTGGGATCAACAAACGTCGGCTCACAGTGGTTACTCAACAGTTCATCGCTCATCATACAAACGAC
 T L K L G E T N G T G C G S T T C A Y S G Y S N S S L I I Q T S L A T N 254
 ATCAGACAAACGGCTGGAGAGGAGATCTGGAGGCTGGCAGTTGGCTAGGCTCATGTGGAGCATGTCTGTTATCTCCACATGGCTGTGATCAATTATCTGTT
 Q T T A C Q R G G S G R S Q F A R S M W S V I S F H M V L I I C F 1210
 CTTTGATGTTGGAGACACTGCAACTGAGCTAGTGGTACATTCAAAAGGTTCTACGATCTAGTGGTATACGATAATGATTGTTGCTGAACCTGCA
 L * 1320
 GACTGGTTATCCAGCTTGAATTGAGTTGACTCTGTTCTTAGAGGAATGAGTGGGACTTGTACGGCTGCTGAATAAAACGTCGATGTATTGTTGAT 1430
 TCTGAAAGGAATATTCAATTAGATAGGATTATTGAAATAAAAGATCCCAACAGTTGGTAAAGGATCTGCA 1540
 327
 推定
 膜貫通領域
 1612

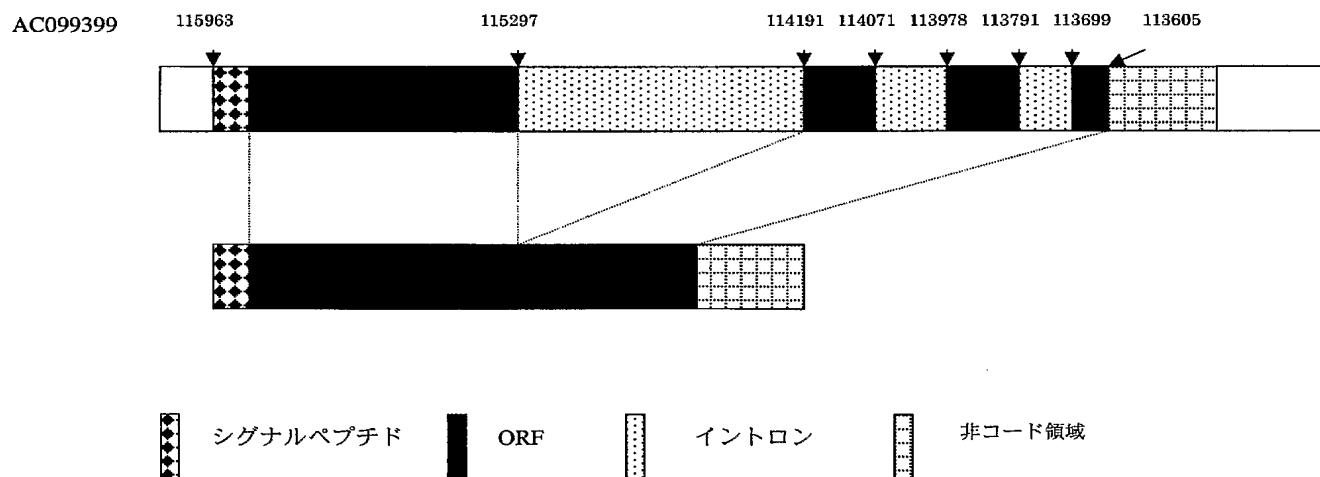
【図 8】

Hind III *Bam*H I
Not I *Xba* I *Eco*R I

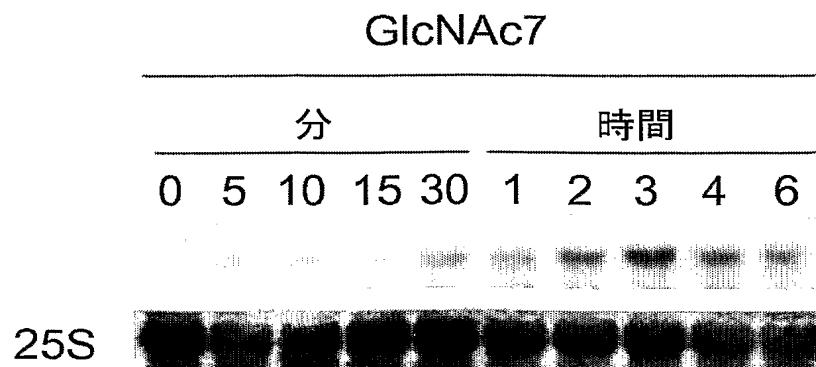
プリマー延伸
 リボソーム

リボソーム延伸
 リボソーム

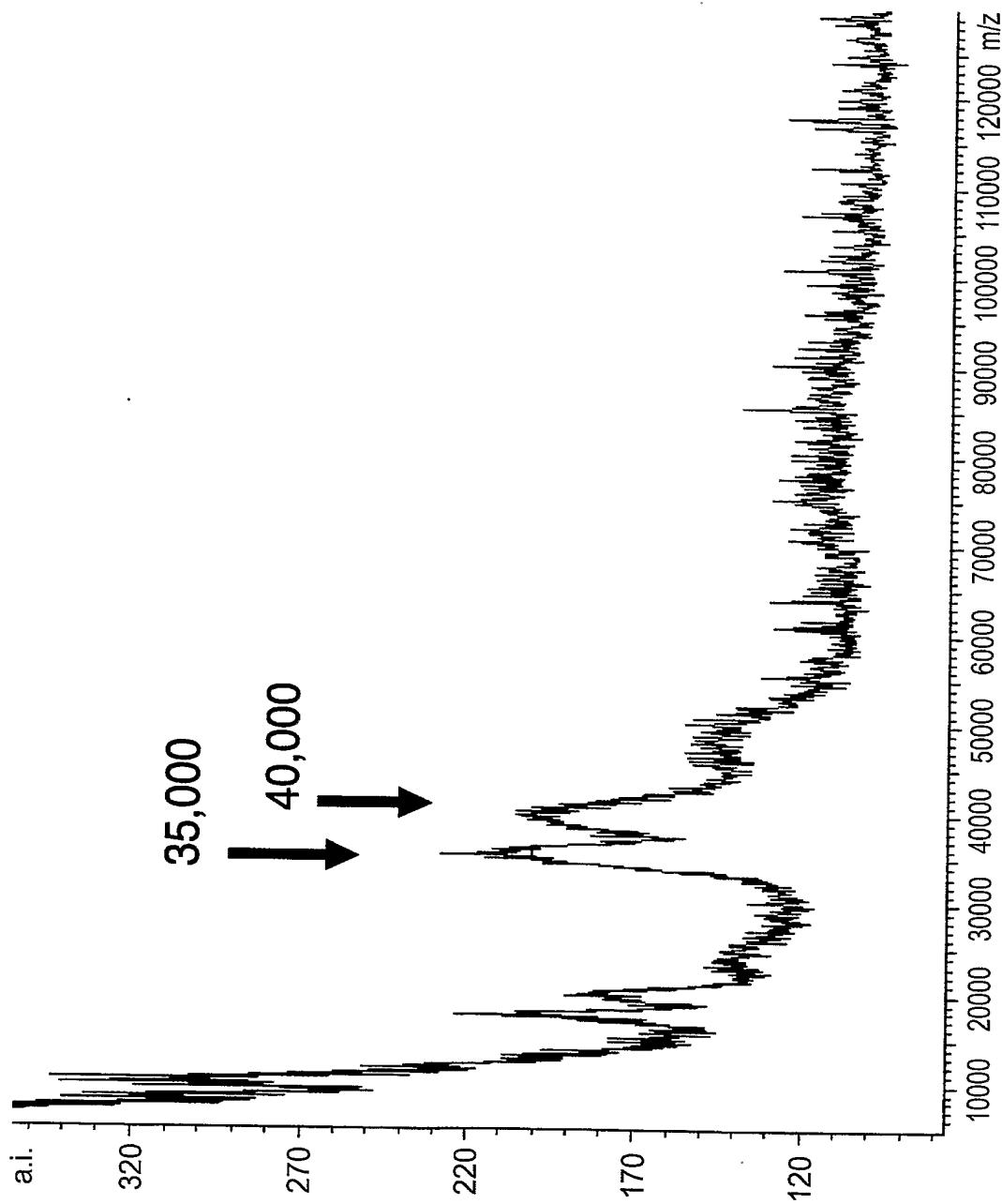
【図 9】



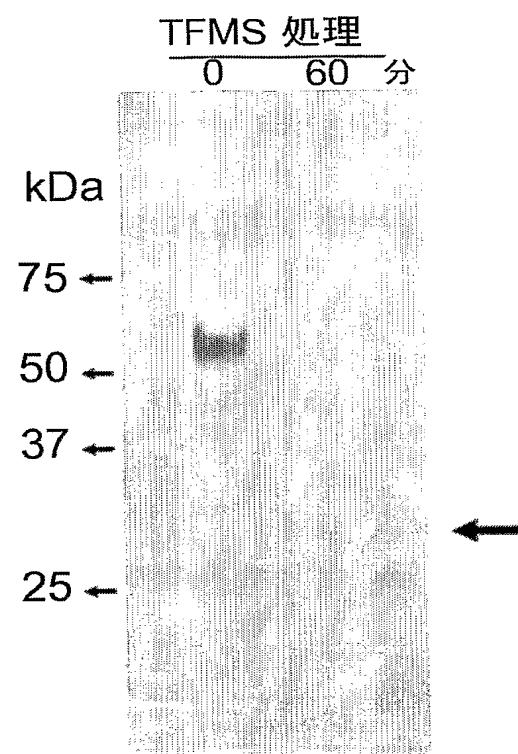
【図 10】



【図11】



【図 12】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】本発明は、キチンオリゴ糖エリシターに結合するタンパク質を同定することを課題とする。

【解決手段】 本発明者らは、APEA誘導体を用いたカラムの開発、非特異的吸着物質除去のためのプレカラム、効果的な溶出法を組み合わせることで収率良くエリシター結合タンパク質を単離精製した。これにより得られたN末端、及び内部鎖アミノ酸配列を利用して、イネcDNAライブラリーから本発明のタンパク質をコードするcDNAの単離に成功した。また、抗Con A-CEBiP抗体を精製し、エリシター応答性活性酸素生成に与える影響を調べたところ、該抗体で前処理することにより活性酸素生成は阻害され、本タンパク質がキチンオリゴ糖エリシター応答に関わる受容体タンパク質であることが示唆された。該エリシターは、イネにいもち抵抗性を誘導するので、本発明のタンパク質は、新規な病害防除技術の開発に応用できる。

【選択図】なし

特願 2004-059551

出願人履歴情報

識別番号 [501167644]

1. 変更年月日 2001年 4月24日

[変更理由] 新規登録

住所 茨城県つくば市観音台2丁目1-2
氏名 独立行政法人農業生物資源研究所

特願 2004-059551

出願人履歴情報

識別番号

[503359821]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

2003年10月 1日

新規登録

埼玉県和光市広沢2番1号

独立行政法人理化学研究所